

# Annexin V in the rat heart

Citation for published version (APA):

Jans, S. W. S. (1997). *Annexin V in the rat heart*. [Doctoral Thesis, Maastricht University]. Universiteit Maastricht. <https://doi.org/10.26481/dis.19970911sj>

**Document status and date:**

Published: 01/01/1997

**DOI:**

[10.26481/dis.19970911sj](https://doi.org/10.26481/dis.19970911sj)

**Document Version:**

Publisher's PDF, also known as Version of record

**Please check the document version of this publication:**

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

**General rights**

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

[www.umlib.nl/taverne-license](http://www.umlib.nl/taverne-license)

**Take down policy**

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

[repository@maastrichtuniversity.nl](mailto:repository@maastrichtuniversity.nl)

providing details and we will investigate your claim.

## SUMMARY

The annexins constitute a family of calcium- and phospholipid-binding proteins. One member of the family annexin V showed to have many different *in vitro* functions. However, the *in vivo* functional significance of annexin V is still incompletely understood. In this thesis our research was directed to annexin V in the cardiac setting.

In the present thesis the possible role of annexin V in the regulation of the phospholipid homeostasis of cardiac myocytes by phospholipase A<sub>2</sub> inhibition was investigated using, on the one hand, an experimental model with artificial phospholipid membranes and, on the other hand, energy-deprived myocytes. In addition, annexin V localization and quantity were studied during maturational and hypertrophic growth of the heart, in order to get an indication whether annexin V could play a role in these processes.

A general introduction of the thesis is provided in chapter 1. An introduction to the various members of the annexin family, cardiac phospholipid homeostasis and cardiac maturational growth is given. In addition, a short survey on the possible functions of annexin V in cardiac phospholipid metabolism and cardiac maturational growth and hypertrophy is provided in this chapter.

Chapter 2 describes in detail our experience with labeling techniques and permeabilization conditions on the subcellular localization of annexin V in the various cardiac cell types. Results were analyzed on the light, confocal scanning laser and electron microscopical level.

The subcellular localization of annexin V in isolated cells was shown to be influenced by permeabilization of the cells. In addition, immunogold labeling of intact cardiac myocytes was regarded to be less reliable as lack of penetration of the antibody-gold particle complex into the cell interior could not be excluded in this experimental approach. The results obtained at the light and electron microscopic level, when labeling was performed on cryosections of cardiac tissue or cells, were considered to be the most trustworthy.

In chapter 3 the presence of a variety of members of the annexin family, including annexin I plus II, III, IV, V and VI, in rat cardiac tissue was established with western blot analysis. Annexin V was purified from rat cardiac tissue and polyclonal antibodies were raised against rat heart annexin V. Western blot analysis with these antibodies revealed that annexin V is present in both cardiomyocytes and non-myocytal cells of the heart. These results were confirmed by immunohistochemical analysis of rat heart tissue sections. Subcellular localization of annexin V in non-myocytal cells seemed to be cytoplasmatic, whereas the localization in the cardiac myocytes was found to be in close vicinity of the sarcolemma. Northern blot analysis demonstrated that all cell types investigated showed expression of annexin V. Annexin V mRNA levels were highest in the fibroblast-like cells, followed by endothelial cells, and a relatively weak signal was observed in cardiomyocytes. By means of a newly developed sandwich-type ELISA with antibodies specific for rat heart annexin V, annexin V content in intact adult rat heart, isolated myocytes, cultured cardiac endothelial cells and fibroblast-like cells was found to be 0.70, 0.17, 1.63 and 3.84 µg/mg total protein, respectively.

The mechanism of inhibiting low molecular weight phospholipase A<sub>2</sub> activity by annexin V is investigated with use of an ellipsometer in chapter 4. The generally proposed mechanism of

phospholipase A<sub>2</sub> inhibition by annexins is through shielding of the phospholipid membranes, the substrate of the phospholipases. In chapter 3 it was shown that although annexin V was present at the level of the sarcolemma the amounts of annexin V in the cardiac myocytes are too low to cover the total membrane and as such a role of annexin V in cardiac phospholipid homeostasis seems questionable. In chapter 4, however, it was shown that partial covering of a phospholipid membrane with annexin V still inhibited phospholipase A<sub>2</sub> activity substantially. In other words, the degree of phospholipase A<sub>2</sub> inhibition was nonlinearly related to the amount of membrane-bound annexin V. These findings indicate that the inhibition of phospholipase A<sub>2</sub>-mediated hydrolysis by annexin V cannot be simply explained by shielding of phospholipid substrates from the enzyme. Moreover, the present results leave room for a role of endogenous annexin V in regulating phospholipid turnover on the sarcolemma of the cardiac myocytes.

Under energy-deprived conditions the phospholipid homeostasis is disturbed. There is net degradation of phospholipids. In chapter 5 we studied the possible role of annexin V, with its anti-phospholipase A<sub>2</sub> properties, in the degradation of membrane phospholipids of adult cardiac myocytes during metabolic inhibition (20 mM 2-deoxyglucose and 1 mM iodo-acetic acid). After 240 min of metabolic inhibition, lactate dehydrogenase (LDH) release was significantly elevated compared to control cells incubated for the same period of time. In metabolically inhibited cells, annexin V localization seemed to be more pronounced at the level of the sarcolemma compared to controls, whereas membrane phospholipid hydrolysis occurred at a significantly elevated rate, as evidenced by a significantly enhanced accumulation of labeled arachidonic acid within the cells. The findings of chapter 5 are not in favor of the hypothesis that the increase in net degradation of phospholipids in energy-deprived cardiac myocytes is caused by a loss of annexin V from the sarcolemma, which would increase the vulnerability of the sarcolemma towards phospholipase A<sub>2</sub> activity.

Amongst others, annexin V has been suggested to play a role in developmental processes. In chapter 6 it was investigated whether in the heart annexin V content and localization change during maturational and hypertrophic growth, in order to obtain indications that annexin V is involved in cardiac growth processes. It was demonstrated that during perinatal development annexin V content in total heart transiently increased in the first week after birth, to a peak value 6 days after birth, whereafter annexin V protein levels declined again. Differences in annexin V content were also observed between myocytes isolated from neonatal and adult hearts. Moreover, during cardiac maturational growth the subcellular localization of annexin V might change from a cytoplasmic to a more prominent sarcolemmal localization. In addition, *in vivo* hypertrophy induced by aortic coarctation was not found to be associated with a change in annexin V localization or content. The quantitative results obtained with intact hypertrophic rat hearts were supported by findings in neonatal ventricular myocytes, in which hypertrophy was induced by phenylephrine (10<sup>-5</sup> M). In conclusion, the marked alterations in annexin V content during the maturational growth in the heart suggest a possible involvement of this protein in this process. In contrast, the absence of changes in annexin V content and localization in hypertrophied hearts/myocytes compared to appropriate control hearts/myocytes suggests that annexin V does not play a crucial role in the maintenance of the hypertrophic phenotype of the cardiac muscle cell.

A general discussion of the studies presented in this thesis is provided in chapter 7. The main conclusions from the research described in the present thesis are the following:

- 1) Annexin V is present in the adult cardiac myocyte at the level of the sarcolemma in relatively small amounts.
- 2) Partial coverage of phospholipid membranes with annexin V leads to a substantial inhibition of phospholipase A<sub>2</sub> activity.
- 3) Besides the substrate depletion model another mechanism has to be active to explain the phospholipase A<sub>2</sub> inhibiting capacity of annexin V.
- 4) During energy-depriving conditions annexin V stays persistently present at the level of the sarcolemma and as such elevated phospholipid degradation under these conditions can not be explained by a substantial loss of annexin V from the sarcolemma.
- 5) As changes in annexin V localization and content in the first week after birth coincide with the switch from maturational hyperplastic to hypertrophic growth annexin V might be involved in the process of maturational growth.

## SAMENVATTING

Alle cellen en hun organellen worden omgeven door een membraan. Eén van de bouwstenen van een membraan zijn fosfolipiden. Deze lipiden worden voortdurend afgebroken en opgebouwd. Dit proces, de fosfolipiden homeostase, is onder normale omstandigheden in balans. Onder pathologische omstandigheden, bijvoorbeeld één waarbij een tekort aan zuurstof optreedt, is de fosfolipiden homeostase zodanig verstoord dat dit resulteert in een netto afbraak van membraanfosfolipiden. Beschadiging van de celmembraan kan uiteindelijk tot celdood leiden. De verstoring van de balans van de fosfolipiden homeostase kan veroorzaakt worden door, óf een verhoogde afbraak van fosfolipiden, óf door een verminderde resynthese van fosfolipiden. Welke mechanismen en factoren een rol spelen in de regulatie van de fosfolipiden homeostase is nog onvolledig opgehelderd. De annexinen, een familie van eiwitten die calcium-afhankelijk aan fosfolipiden kunnen binden, zijn een mogelijke factor van betekenis in de regulatie van de fosfolipiden huishouding, omdat de annexinen het enzym remmen dat de fosfolipiden afbreekt, namelijk fosfolipase  $A_2$ .

In dit proefschrift is onderzocht of een lid van de annexine familie, annexin V, mogelijk een rol speelt in de regulatie van de fosfolipide homeostase van de cardiomyocyt door remming van het fosfolipase  $A_2$  enzym. Daarbij kunnen andere mogelijke functies van annexine V in het hart niet worden uitgesloten. Ook werd onderzocht of de cellulaire lokalisatie en hoeveelheid van annexine V veranderden gedurende de ontwikkelings-groei van het hart en na hypertrofe groei (groei zonder deling). Dit onderzoek is uitgevoerd om inzicht te krijgen of annexine V mogelijk een rol speelt in deze processen.

Enkele algemene aspecten van de fosfolipiden huishouding, de verschillende leden van de annexinen familie en de processen geassocieerd met cardiale groei worden beschreven in hoofdstuk 1. Tevens wordt een overzicht gegeven van annexine V en zijn fosfolipase remmende werking en annexine V in verband met groei en ontwikkeling.

In hoofdstuk 2 worden een aantal technieken, die mogelijk geschikt zijn om de lokalisatie van annexine V op hartweefsel en cellen aan te tonen, met elkaar vergeleken. De methode, waarbij gebruik gemaakt wordt van antilichamen tegen het te lokaliseren eiwit (anti-rattenhart annexine V antilichamen) en van antilichamen met een herkenbaar label zoals een fluorescerend of goud bolletje gericht tegen de anti-rattenhart annexine V antilichamen, wordt immunohistochemie genoemd. Met behulp van, respectievelijk, een fluorescentie- of een elektronenmicroscop, kan het label zichtbaar gemaakt worden en zo de lokalisatie van het eiwit in de cel of het weefsel bepaald. Om het eiwit bereikbaar voor de antilichamen te maken kan men de cellen doorlaatbaar maken met detergentia zoals Triton X-100 of saponine. In hoofdstuk 2 wordt aangetoond dat het gebruik van detergentia niet aan te raden is, omdat deze de immunolokalisatie lijken te veranderen. Deze veranderingen in immunolokalisatie worden mogelijk veroorzaakt door de zware beschadigingen van de celstructuren die tijdens deze procedure optreden. Ook wordt immunolabeling van intacte volwassen cardiomyocyten, waarbij een goud bolletje gekoppeld is aan een antilichaam, als minder betrouwbaar beschouwd. De oorzaak hiervan is dat met deze methode, waarbij goudbolletjes alleen aan de hartspiercelmembraan gevonden werden, niet duidelijk is of het complex in staat is volledig tot de kern van de cel te penetreren. De meest

betrouwbare resultaten worden verkregen door kleuring op dunne ingevroren hartweefsel- of celplakjes (coupes).

In hoofdstuk 3 is allereerst bepaald welke leden van de annexinen familie aanwezig zijn in het hart met behulp van Western blot analyse. Van de geteste eiwitten bleek annexine I en II, III, IV, V en VI aanwezig. Annexine V was zeer prominent aanwezig en daarom is dit lid van de familie verder onderzocht. Omdat al onze testen op het rattenhart werden uitgevoerd werd eerst een antilichaam verkregen dat specifiek gericht is tegen rattenhart annexine V. Hiertoe werd annexine V gezuiverd uit rattenhartjes en vervolgens werd een konijn met het gezuiverde eiwit geïmmuniseerd om tot antilichaam productie te komen. De antilichamen, die specifiek gericht zijn tegen rattenhart annexine V, werden gebruikt om aan te tonen in wel celtype van het hart en waar in deze celtypes annexine V aanwezig is. Western blot analyse en immunohistochemie op coupes van rattenhart weefsel laten zien dat annexine V aanwezig is in alle celtypes van het rattenhart, zowel de hartspiercellen als ook de endotheelcellen en de fibroblasten. In volwassen hartspiercellen is annexine V gelokaliseerd ter hoogte van het celmembraan, het sarcolemma, in tegenstelling tot de andere celtypen van het hart waar een cytoplasmatische kleuring van annexine V werd gevonden. Aantoning van annexine V op mRNA niveau (Northern blot analyse), waaruit afgeleid kan worden of annexine V ook in deze cel types wordt gesynthetiseerd, laat eveneens expressie zien in alle celtypes van het hart. De hoogste mRNA expressie werd gevonden in de fibroblast-achtige cellen en de laagste waarden in de hartspiercellen met tussenliggende waarden in endotheelcellen. De annexine V eiwit niveau's werden ook gekwantificeerd. Hiervoor werd een ELISA methode van het sandwich type ontwikkeld met antilichamen specifiek gericht tegen rattenhart annexine V. De annexine V inhoud in rattenhartweefsel, geïsoleerde hartspiercellen, gekweekte endotheelcellen en fibroblasten bedroeg respectievelijk, 0.70, 0.17, 1.63 en 3.84  $\mu\text{g}/\text{mg}$  totaal eiwit.

Aangezien annexine V ter hoogte van het sarcolemma van de hartspiercel gevonden wordt, is een rol voor annexine V in de fosfolipiden huishouding van het hartspiercelmembraan mogelijk. Als *mogelijk mechanisme voor de remmende werking van annexine V op de fosfolipase A<sub>2</sub> activiteit* is afscherming van de membraanfosfolipiden, het substraat voor fosfolipase A<sub>2</sub>, (het zogenaamde substraat-depletie model) voorgesteld. De hoeveelheid annexine V, die aangetoond kan worden in de hartspiercel, wijst erop dat dit niet voldoende is om de gehele binnenzijde van het sarcolemma af te screenen. In hoofdstuk 4 werd met behulp van kunstmatige membranen (ellipsometrie), onder condities die zoveel als mogelijk lijken op de omstandigheden in de hartspiercellen, onderzocht of gedeeltelijke bedekking van een fosfolipidenmembraan door annexine V gevolgen heeft voor de hydrolytische activiteit van fosfolipase A<sub>2</sub>. Er werd aangetoond dat een gedeeltelijke bedekking van het fosfolipide membraan de fosfolipase A<sub>2</sub> activiteit reeds aanzienlijk remt. Deze gegevens impliceren dat de remmende werking van annexine V op de activiteit van fosfolipase A<sub>2</sub> niet alleen door afscherming van het substraat (de membraanfosfolipiden) verklaard kan worden. Naast het substraat-depletie model is dus nog een ander, onbekend proces aanwezig. Verder toonden de resultaten in hoofdstuk 4 aan dat een rol voor annexine V in de fosfolipiden huishouding van het sarcolemma mogelijk is, zelfs bij een onvolledige bedekking van het sarcolemma.

Onder omstandigheden waarbij een zuurstof tekort optreedt, zoals bij een cardiale ischemie,

is de fosfolipiden huishouding verstoord. Er treedt netto afbraak van fosfolipiden op. In hoofdstuk 5 hebben we de mogelijke rol van annexine V in de afbraak van membraanfosfolipiden van geïsoleerde volwassen hartspiercellen bestudeerd onder energie-gedepriveerde omstandigheden door middel van metabole inhibitie. Dit experimenteel model leidt tot uitputting van de energie-voorraad van de cel, een situatie die ook in een ischemische cel optreedt. Na 120 en 240 minuten metabole inhibitie zijn de mate van celschade, de fosfolipide afbraak en de annexine V lokalisatie bepaald. Omdat schade aan hartspiercellen leidt tot het weglekken van lactaat dehydrogenase (LDH) uit de cel, werd de activiteit van dit enzym bepaald in de hartspiercellen en de bovenstaande vloeistof. Na 240 minuten metabole inhibitie was het LDH-verlies uit de hartspiercellen significant verhoogd in vergelijking met controle cellen. In metabool geremde cellen bleek annexine V sterker aanwezig aan het sarcolemma vergeleken met controle cellen. De fosfolipide afbraak was significant versneld, wat aangetoond werd door een verhoogd gehalte van veresterd arachidonzuur. Vrij arachidonzuur ontstaat door een fosfolipase A<sub>2</sub> gemedieerde hydrolyse van fosfolipiden. Deze resultaten laten zien dat de verhoogde netto fosfolipiden afbraak onder energie-gedepriveerde omstandigheden waarschijnlijk niet veroorzaakt worden door verlies van annexine V van het sarcolemma, hetgeen de gevoeligheid van de sarcolemmale fosfolipiden voor fosfolipase A<sub>2</sub> zou verhogen.

Een ander functie, die voor annexine V is voorgesteld, is een rol in groeiprocessen. In hoofdstuk 6 werd bestudeerd of de annexine V hoeveelheid en lokalisatie veranderen gedurende de groei in het ontwikkelende hart en hypertrofie (groei door volume vergroting van cellen, dus zonder celdeling) van het rattenhart. Deze gegevens geven mogelijk een aanwijzing van de betrokkenheid van annexine V in groeiprocessen van het hart. De annexine V inhoud en lokalisatie werd bestudeerd in rattenharten van vlak voor de geboorte tot de volwassen leeftijd van 12 weken. Opvallend was dat de hoeveelheid annexine V in het rattenhart steeg vlak naar de geboorte, waarna het weer daalde tot het niveau van voor de geboorte. De annexine V lokalisatie leek in de hartspiercellen van 2 tot 3 dagen oude ratten cytoplasmatisch, terwijl in het volwassen hart de lokalisatie ter hoogte van het sarcolemma was. Uit de literatuur is bekend dat in de eerste week na de geboorte ook een belangrijke verandering in het groeiproces optreedt. Het hart gaat namelijk over van groei door deling naar groei door volume vergroting van cellen. Deze verandering gaat tevens gepaard met een verhoging of verlaging van de cellulaire inhoud van een aantal specifieke eiwitten. Aangezien de tijdelijke verhoging van de annexine V inhoud samen lijkt te vallen met deze verandering in groei karakteristieken, impliceren deze resultaten dat annexine V mogelijk betrokken is bij de omslag in het groeiproces van het hart in de eerste week na de geboorte. Tevens is bestudeerd of hypertrofie van het hart geassocieerd is met een verandering in annexine V lokalisatie en/of hoeveelheid. Hypertrofie werd in rattenharten geïnduceerd door afbinding van de aorta (aorta coarctatie) en in geïsoleerde volwassen hartspiercellen door behandeling met fenylefrine. In de hypertrofe rattenharten werd geen verandering in de lokalisatie en hoeveelheid annexine V gevonden. Onveranderde annexine V hoeveelheden werden ook gevonden in de geïsoleerde neonatale hartspiercellen die hypertroof waren gemaakt door fenylefrine. Dit suggereert dat annexine V niet betrokken is bij het instandhouden van het hypertrofe fenotype. Over de rol van annexine V in de ontwikkeling van hypertrofie kan evenwel nog geen uitspraak gedaan worden.

In hoofdstuk 7 worden de resultaten zoals beschreven in dit proefschrift samengevat en in een breder kader geplaatst. De belangrijkste conclusies van dit proefschrift zijn:

- 1) Annexine V is aanwezig in de hartspiercel aan het sarcolemma in relatief kleine hoeveelheden.
- 2) Gedeeltelijke bedekking van een fosfolipidenmembraan met annexine V remt substantieel de fosfolipase  $A_2$  activiteit.
- 3) Naast het substraat depletie model moet er nog een ander mechanisme aanwezig zijn om het fosfolipase  $A_2$  remmende vermogen van annexine V te verklaren.
- 4) Gedurende deprivatie van energie blijft annexine V gebonden aan het sarcolemma, en dientengevolge kan de verhoogde fosfolipiden afbraak onder deze omstandigheden niet verklaard worden door een aanzienlijk verlies van annexine V van het celmembraan.
- 5) Daar de veranderingen in de hoeveelheid en lokalisatie van annexine V samenvallen met de verandering van hyperplastische naar hypertrofe groei, kan annexine V mogelijk bij het proces van de groei van het hart gedurende de ontwikkeling betrokken zijn.